

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

2 745 718

(21) N° d' enregistrement national :

96 02955

(51) Int Cl⁶ : A 61 K 31/195, A 61 K 35/78

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 08.03.96.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : SOCIETE CIVILE DE GESTION
JOUVENET SOCIETE CIVILE — FR.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 12.09.97 Bulletin 97/37.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

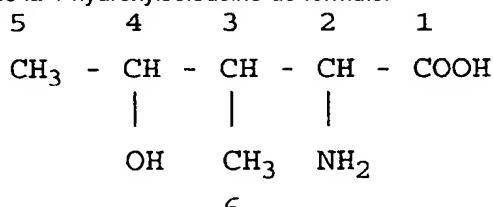
(72) Inventeur(s) : SAUVAIRE YVES et RIBES GERARD.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : CABINET HERRBURGER.

(54) COMPOSITION ANTIDIABÉTIQUE A BASE DE 4-HYDROXYISOLEUCINE.

(57) Composition antidiabétique apte à stimuler la sécrétion d'insuline et spécialement destinée au traitement du diabète non insulino dépendant, caractérisée en ce qu'elle renferme, en tant que substance active, l'isomère (2S, 3R, 4S) de la 4-hydroxyisoleucine de formule:



et/ou sa forme lactonique, et en ce qu'elle est pratiquement exempte de tout autre stéréoisomère de ce composé.

FR 2 745 718 - A1

« Composition antidiabétique à base de 4-hydroxyiso-leucine »

La présente invention se rapporte à une composition antidiabétique apte à stimuler la sécrétion d'insuline et spécialement destinée au traitement du diabète de type II ou diabète non insulino dépendant.

Il est connu que le diabète touche, aujourd'hui, plus de trente millions d'individus dans le monde, prenant la dimension d'un phénomène majeur sur le plan de la santé publique ; à titre d'exemple, on considère que, dans les pays européens, le diabète atteint entre 2 et 5 % de la population, et qu'en France, environ 3 à 4 % des habitants souffrent de diabète non insulino dépendant qui est de loin le plus fréquent et en particulier entre 5 et 10 % des sujets âgés de 60 à 70 ans souffrent de cette maladie.

De plus, et pour diverses raisons liées notamment à la richesse alimentaire, l'obésité, le tabagisme ou encore la diminution de l'activité physique, le nombre de diabétiques aurait doublé en France en une vingtaine d'années, essentiellement du fait d'une augmentation du diabète non insulino dépendant.

Cette affection est caractérisée par une altération de la sécrétion d'insuline associée ou non à une insulino résistance des tissus périphériques. L'altération du fonctionnement des cellules B pancréatiques qui synthétisent l'insuline, survient dès la phase initiale du diabète

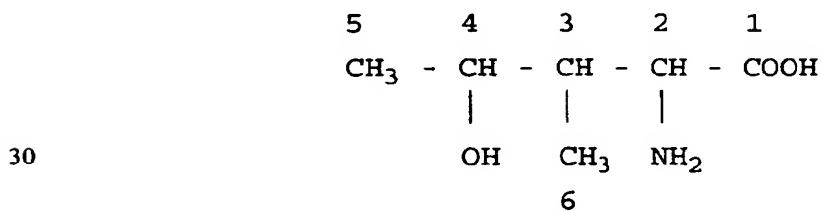
non insulino dépendant. Elle se traduit par une très nette diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation glucosée.

5 Pour traiter cette maladie, les spécialistes ont en conséquence été tout naturellement amenés à rechercher des produits susceptibles de stimuler la sécrétion d'insuline ; parmi ceux-ci, seuls les sulfamides (sulfonylurées) ont, dans un premier temps, révélé une efficacité.

10 Cependant, malgré leurs avantages, les sulfonylurées présentent un certain nombre d'inconvénients avant tout liés aux difficultés rencontrées pour déterminer la posologie adéquate ; il en résulte des risques de surdosage pouvant provoquer fréquemment des hypoglycémies, avec risque de coma hypoglycémique, notamment chez les personnes 15 âgées.

20 Pour remédier à ces inconvénients, on a en conséquence cherché à proposer un médicament de nature à se substituer aux sulfonylurées pour stimuler la sécrétion d'insuline.

25 C'est ainsi que, conformément au document EP-0 587 476, on a pu mettre en lumière les propriétés antidiabétiques de certains acides aminés mono ou polyhydroxylés parmi lesquels le plus actif s'est révélé être la 4-hydroxyisoleucine de formule :



et/ou sa forme lactonique.

35 Conformément à cette publication, on a en particulier proposé un procédé d'extraction de la 4-

hydroxyisoleucine à partir de graines d'une espèce particulière de trigonelles (Trigonella sp : le fenugrec Trigonella foenum-graecum L) qui est une légumineuse facilement cultivable dans les régions méditerranéennes.

5 Ce procédé consiste à mettre en oeuvre les étapes suivantes :

- on soumet des graines de fenugrec à un broyage et à une extraction préalable à l'hexane, à température ambiante de façon à obtenir un tourteau délipidé,
- 10 - on soumet ce tourteau à plusieurs extractions hydro-alcooliques successives avec de l'éthanol à 70 % à température ambiante,
- on concentre l'extrait obtenu sous pression réduite,
- 15 - on fait passer le concentrat sur une colonne contenant une résine échangeuse de cations sous forme H⁺ de façon à retenir la 4-hydroxyisoleucine recherchée sur cette colonne,
- on élue celle-ci en utilisant une solution d'ammoniaque N ou 2N,
- 20 - après concentration et reprise par de l'éthanol à 70 %, on soumet le mélange obtenu à une chromatographie d'adsorption sur gel de silice, et
- on élue celui-ci avec de l'éthanol à 70 % avant de le concentrer sous vide et de le purifier par cristallisation avec addition d'éther diéthylique de façon à obtenir 25 une 4-hydroxyisoleucine titrant 99 % de pureté.

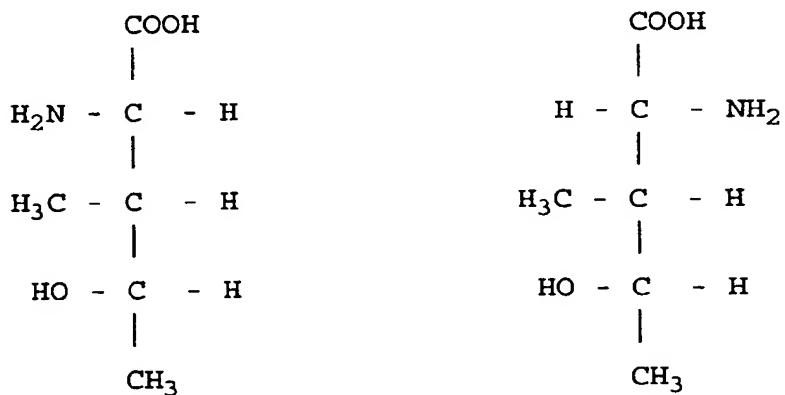
Pour permettre aux malades de pouvoir bénéficier des propriétés antidiabétiques toutes particulières de la 4-hydroxyisoleucine, il a été décidé de poursuivre les recherches sur ce produit : en effet, la mise sur le marché d'un médicament nouveau exige une connaissance et une description précise du principe actif ; or, le squelette de la 4-hydroxyisoleucine renferme trois carbones asymétriques successifs et comporte, par suite, huit stéréo-isomères 30 pouvant être définis par les notations standardisées (2S,

(3R, 4S) ; (2S, 3R, 4R) ; (2R, 3S, 4R) ; (2R, 3S, 4S) ; (2S, 3S, 4S) ; (2S, 3S, 4R) ; (2R, 3R, 4R) ; (2R, 3R, 4S).

Compte tenu de cette situation, on a eu l'idée de rechercher, conformément à l'invention, au(x)quel(s) de ces isomères devaient être attribuées les caractéristiques antidiabétiques ou tout au moins l'essentiel de ces caractéristiques.

On a, à cet effet, tenu compte des travaux de Fowden et al. (Phytochemistry, 1973, vol.13, pp. 1707 à 1711) et d'Alcock et al (Phytochemistry, 1989, vol.28, pp. 1835-1841) conformément auxquels on a pu établir qu'à l'état naturel, le Fenugrec ne renferme que deux isomères de la 4-hydroxyisoleucine (diastéréoisomères sur le carbone 2) à savoir les isomères suivants :

15



Isomère (2S, 3R, 4S)

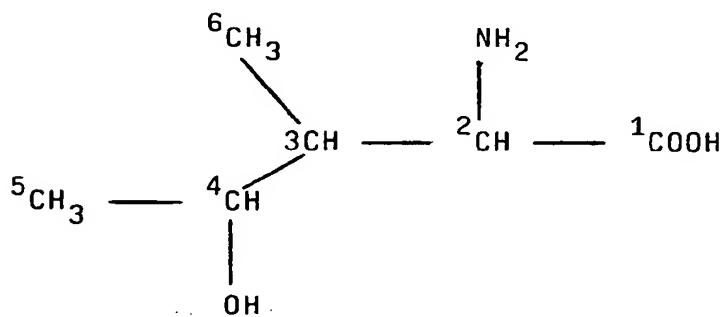
Isomère (2R, 3R, 4S)

Plus précisément, il a été prouvé que le Fenugrec renferme environ 97 % d'isomère (2S, 3R, 4S) qui doit donc être considéré comme l'isomère majeur et environ 3 % d'isomère (2R, 3R, 4S) qui doit être considéré comme l'isomère mineur.

Conformément à l'invention, on a constaté expérimentalement que lorsque l'on extrait des graines de Fenugrec par le procédé susmentionné, décrit dans le document

20

EP-A-0 587 476, à petite échelle, on obtient la 4-hydroxyisoleucine en conservant essentiellement les proportions susmentionnées d'isomère majeur et d'isomère mineur ; les caractéristiques physico-chimiques de l'isomère majeur ont été déterminées et correspondent à la structure (2S, 3R, 4S).



Cette configuration a pu être attribuée grâce aux mesures suivantes et par analogie avec les travaux antérieurs :

- Pouvoir rotatoire (Perkin-Elmer) $[\alpha]_D^{20}$: + 31.3 ($c=1.2$, H_2O).
- Spectrométrie infrarouge (Perkin-Elmer, FT-IR, Paragon 1000) dont les résonances sont les suivantes en cm^{-1} : ν_{max} 3500-2000, 1634, 1490, 1415, 1356, 1312, 1270, 1180, 1104, 1053, 1017, 962, 931, 899, 858, 817, 794.
- Spectrométrie de masse (JEOL, JMS-SX 102A) selon la technique « fast atom bombardement » en modes positif et négatif avec une matrice de glycérol-thioglycérol : FAB+ : 148 ($M+H$)⁺ 100 ; FAB- : 146 ($M-H$)⁺ 100
- Spectrométrie RMN ^1H et ^{13}C (Bruker AC 250 MHz) dont les déplacements chimiques sont les suivants (en ppm : δ)
 - ^1H NMR δ : 1 (d, 3H, $J=7$, $\text{CH}_3\text{C}-3$) ; 1,29 (d, 3H, $J=6,3$, $\text{CH}_3\text{C}-4$) ; 1,97 (qdd, 1H, $J=7/4/8$, $\text{CH}-3$) ; 3,88 ((qd, 1H, $J=8/6,3$, $\text{CH}-4$) ; 3,94 (d, 1H, $J=4$, $\text{CH}-2$).

^{13}C NMR δ : 38,6(C₆), 47,2(C₅), 67,8(C₃), 83,5(C₂), 96,4(C₄), 200(C₁).

Les figures 1a à 1f ont permis d'établir les 5 caractéristiques physico-chimiques de l'isomère (2S, 3R, 4S) de la 4-hydroxyisoleucine.

Plus précisément, la figure 1a correspond à la chromatographie HPLC tandis que les figures 1b à 1f représentent respectivement le spectre IR, le spectre de masse « FAB » mode positif, le spectre de masse « FAB » mode négatif, le spectre RMN¹H et le spectre RMN¹³C.

On s'est, en revanche, rendu compte que si l'on transpose le procédé susmentionné à une échelle supérieure pour laquelle les différentes étapes exigent des temps plus importants, on obtient un produit comportant environ 85 à 15 % d'isomère majeur et environ 10 à 15 % d'isomère mineur.

Partant de ces constatations, on a cherché à séparer les deux diastéréoisomères par chromatographie en utilisant une colonne semi-préparative ultrabase C₁₈ qui est caractérisée par une hydrophobicité élevée et un indice de silanol résiduel très faible, donc une capacité de rétention élevée ; il est connu que de telles colonnes sont adaptées pour effectuer la séparation de composés présentant des groupements fonctionnels très polaires, comme les substances acides ou basiques.

On a ainsi purifié 2 grammes d'un mélange obtenu suite à la mise en oeuvre du procédé susmentionné dans les conditions suivantes :

- Support : colonne semi-préparative ultrabase C₁₈,
5 μM (10 mm x 15 cm)
- Détecteur : UV (190 à 220 nm) ou réfractomètre,
- Eluant : eau pure,
- 5 - Débit : 2 ml/min.

Il est à noter que l'utilisation d'eau pure comme solvant de dilution s'est avérée indispensable car l'alcool perturbe la séparation.

10 Une étude analytique préalable effectuée sur 10 μg de mélange a permis de vérifier que le temps de rétention était de 9,6 min. pour l'isomère mineur et de 10,2 min. pour l'isomère majeur et qu'il était donc ainsi possible de séparer les deux isomères présents.

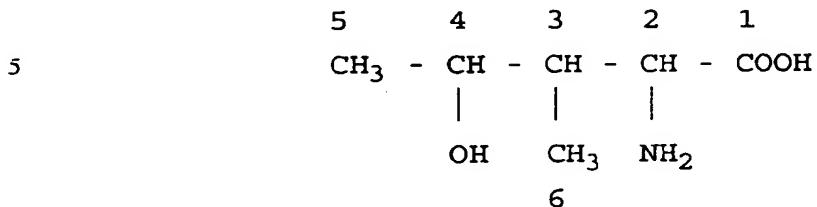
15 Cette possibilité a été confirmée par l'expérience et, la mise en oeuvre du procédé de séparation a effectivement permis d'obtenir, à partir des deux grammes initiaux, et après purification, d'une part, plus de 400 mg 20 d'isomère mineur pratiquement pur et d'autre part, environ 1,5 g d'isomère majeur avec une pureté de 97 à 98 % identique au composé isolé à partir du document EP-A-0 587 476.

Conformément à l'invention, on a ensuite mis en oeuvre des tests pharmacologiques pour vérifier l'activité antidiabétique de chacun des isomères ainsi purifiés et on a constaté que le plus puissant (eutomer) renfermant la 25 majeure partie de l'activité antidiabétique est l'isomère majeur tandis que l'isomère mineur s'avère nettement moins puissant (distomer).

La présente invention a pour objet de tirer 30 profit de ces constatations expérimentales en proposant une composition antidiabétique nouvelle apte à stimuler la sécrétion d'insuline et spécialement destinée au traitement du diabète non insulino dépendant.

Conformément à l'invention, cette composition 35 antidiabétique est caractérisée en ce qu'elle renferme, en

tant que substance active, l'isomère (2S, 3R, 4S) de la 4-hydroxyisoleucine de formule :



10 et/ou sa forme lactonique, et en ce qu'elle est pratiquement exempte de tout autre stéréoisomère de ce composé.

Selon une caractéristique préférentielle de l'invention, cette substance active est d'origine végétale, et est notamment obtenue à partir de trigonelles 15 (Trigonella sp.) et plus particulièrement extraite de graines de fenugrec (Trigonella foenum-graecum L).

20 L'activité antidiabétique toute particulière de l'isomère (2S, 3R, 4S) de la 4-hydroxyisoleucine sera mise en lumière grâce à l'exemple suivant, portant sur une investigation au niveau des îlots de Langherans isolés de pancréas de rat.

Après digestion du pancréas par la collagénase, les îlots de Langerhans qui possèdent des cellules B sécrétant l'insuline ont été séparés des autres éléments du digestat, prélevés sous la loupe binoculaire, puis déposés dans des tubes d'incubation. Cette méthode, qui présente l'avantage de ne nécessiter qu'une faible quantité de substance, permet une étude directe des effets de la composition sur des cellules endocrines pancréatiques, en particulier des cellules B insulino sécrétrices, à l'exclusion de toute interférence avec les tissus exocrines et annexes.

Sur des îlots isolés de rats Wistar, incubés en présence de 8,3 mM de glucose (1,5 g/l) pendant une heure, 35 on a recherché l'effet de 200 µM d'isomère majeur de la 4-

hydroxyisoleucine, d'une part, et de 500 μM et 1 mM d'isomère mineur d'autre part, sur la sécrétion d'insuline. Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 2, sur lequel les histogrammes représentent pour chaque dose 5 d'isomère de 4-hydroxyisoleucine la sécrétion d'insuline mesurée sur 60 minutes. Les valeurs données correspondent à chaque fois à la moyenne de 16 à 20 déterminations.

Sur ce schéma, on peut noter que pour l'isomère majeur, un effet stimulant significatif sur la sécrétion 10 apparaît pour une concentration de 200 μM , alors que dans le cas de l'isomère mineur, cet effet n'est observé que pour une concentration de 1 mM.

Cette étude pharmacologique permet donc bien de mettre en lumière l'activité supérieure de l'isomère majeur. 15

Ces résultats ont été confirmés par des expériences réalisées sur le pancréas isolé et perfusé en présence de 8,3 mM de glucose.

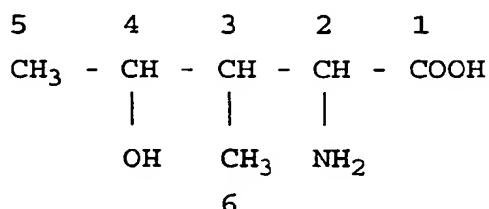
Conformément à ces expériences, dont les résultats 20 sont reportés sur la figure 3, l'isomère majeur et l'isomère mineur de la 4-hydroxyisoleucine ont été introduits à une concentration de 200 μM dans le milieu de perfusion pendant 10 minutes.

Les valeurs données correspondent à chaque fois 25 à la moyenne de 4 à 6 expériences.

Ce schéma montre clairement que, dans le cas de l'isomère majeur, la stimulation est immédiate et biphasique et persiste pendant toute la durée de la perfusion alors qu'au contraire, aucun effet notable n'est observé 30 dans le cas de l'isomère mineur.

R E V E N D I C A T I O N S

1°) Composition antidiabétique apte à stimuler la sécrétion d'insuline et spécialement destinée au traitement du diabète non insulino dépendant, caractérisée en ce qu'elle renferme, en tant que substance active, l'isomère (2S, 3R, 4S) de la 4-hydroxyisoleucine de formule :



et/ou sa forme lactonique, et en ce qu'elle est pratiquement exempte de tout autre stéréoisomère de ce composé.

2°) Composition antidiabétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la substance active est d'origine végétale.

3°) Composition antidiabétique selon la revendication 2, caractérisée en ce que la substance active est obtenue à partir de trigonelles (Trigonella sp).

4°) Composition antidiabétique selon la revendication 3, caractérisée en ce que la substance active est extraite de graines de fenugrec (Trigonella fœnum-graecum L).

2745718

118

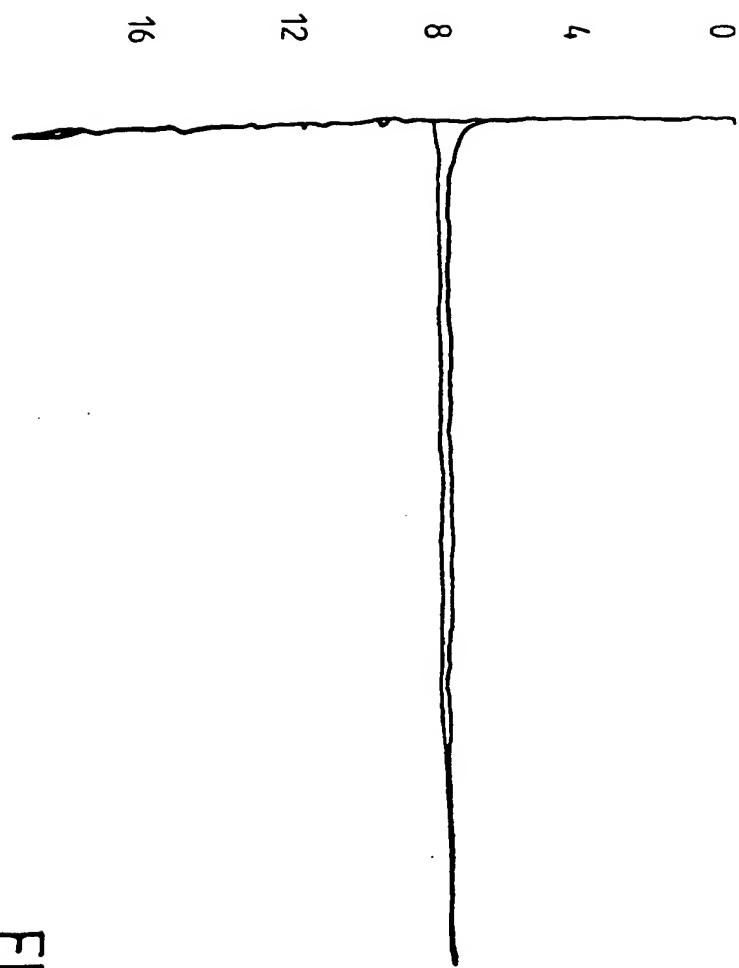


FIG. 1a

2745718

218

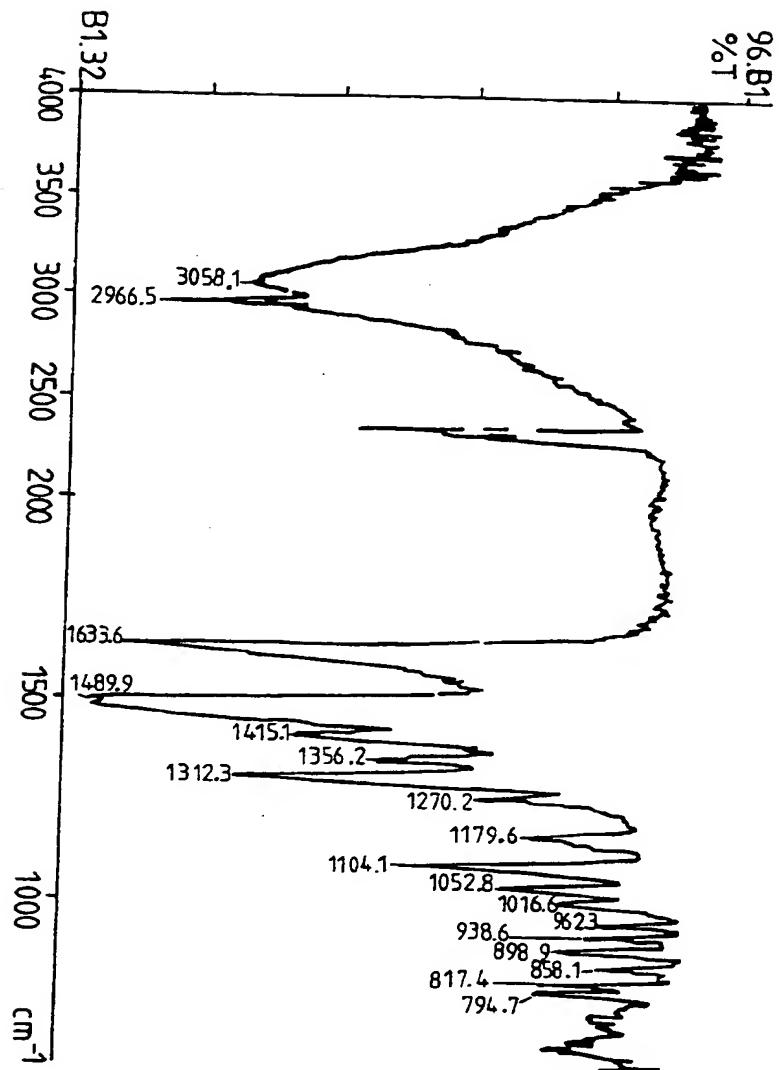


FIG. 1b

2745718

318

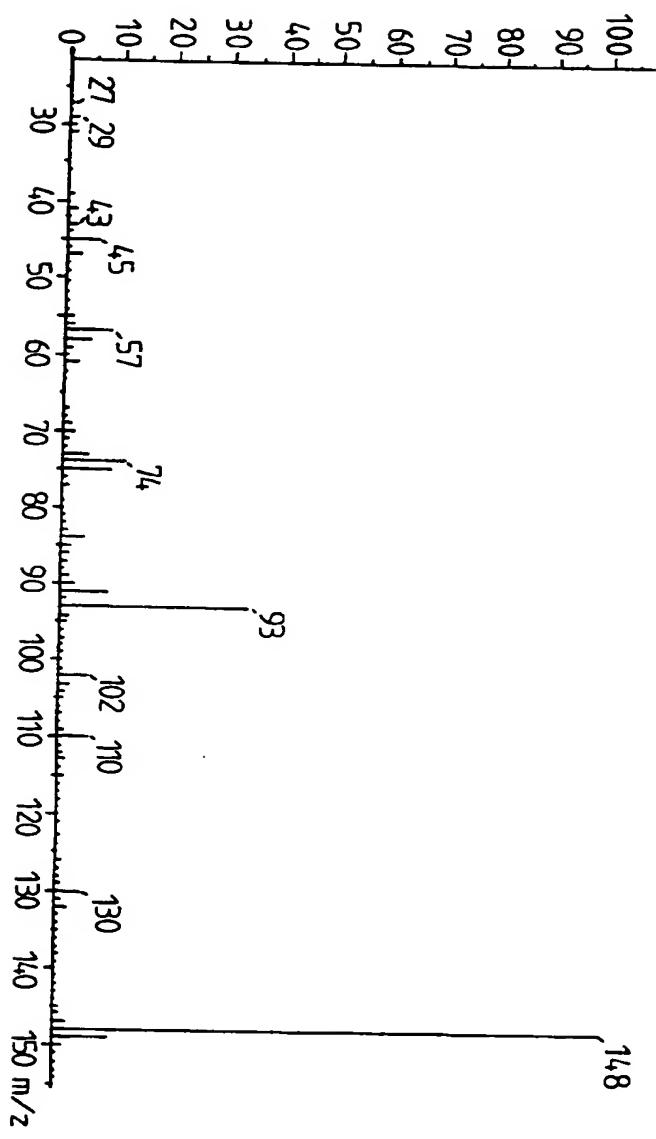


FIG. 1c

2745718

418

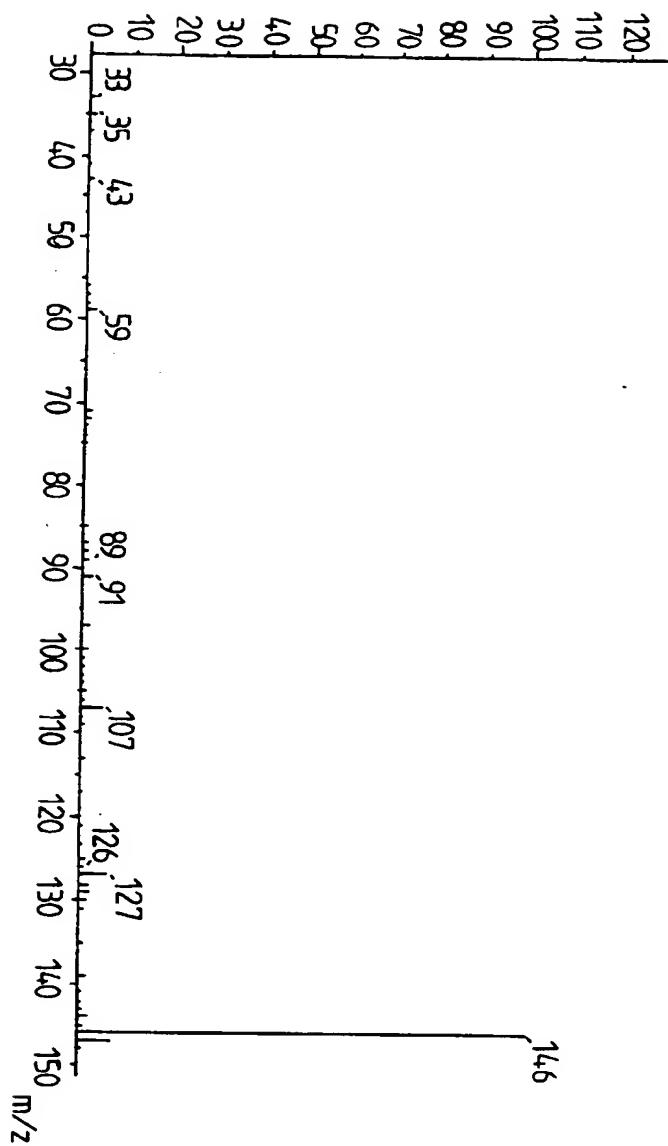


FIG. 1d

2745718

518

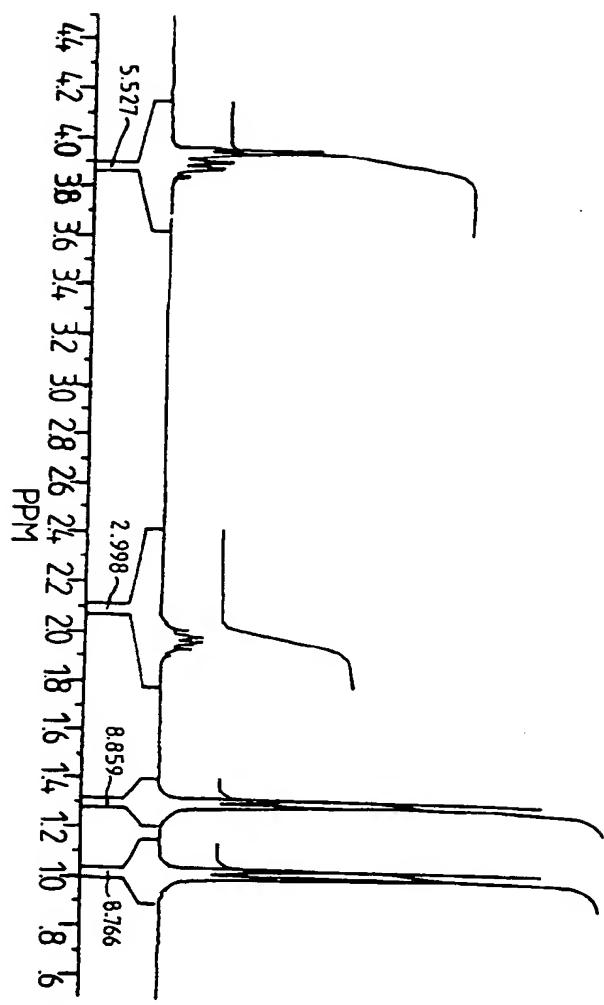


FIG. 1e

2745718

618

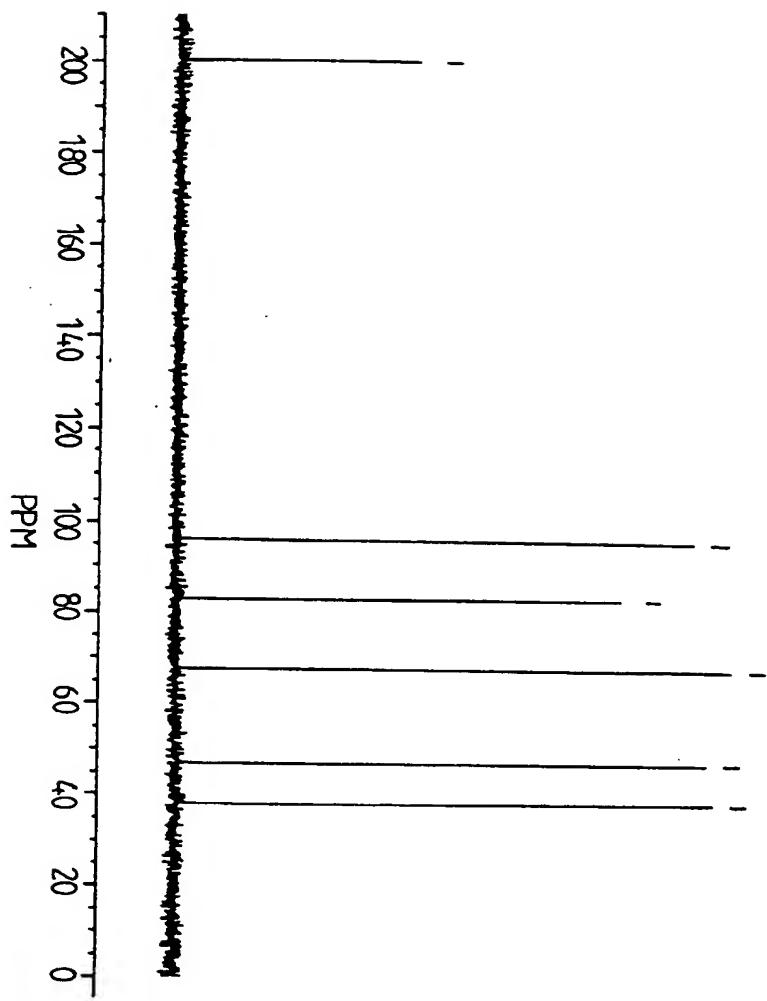
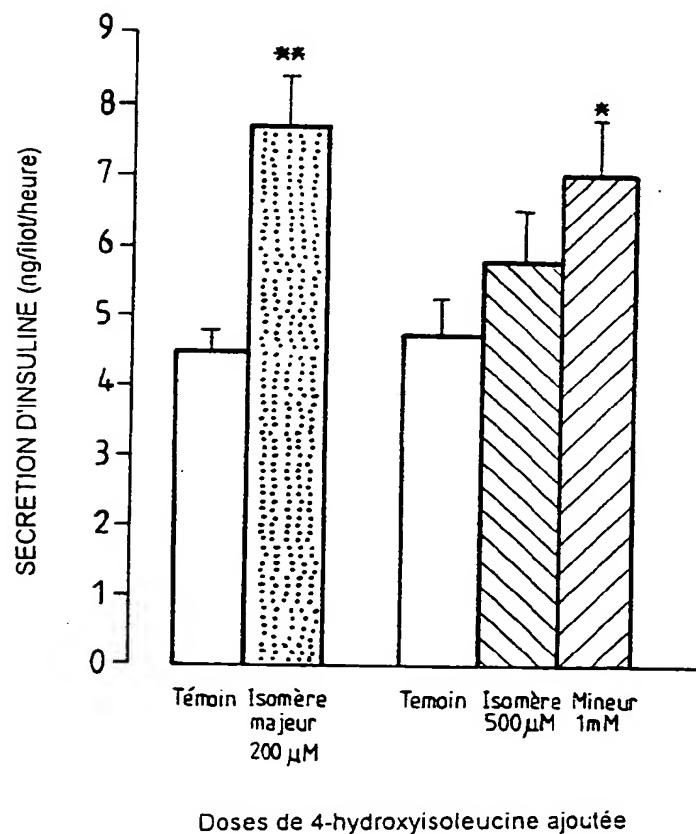


FIG. 1f

Evaluation des effets comparés de l'isomère majeur et de l'isomère mineur de la 4-hydroxyisoleucine sur la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans isolés et incubés en présence de glucose 8,3 mM



* p < 0,05
** p < 0,001

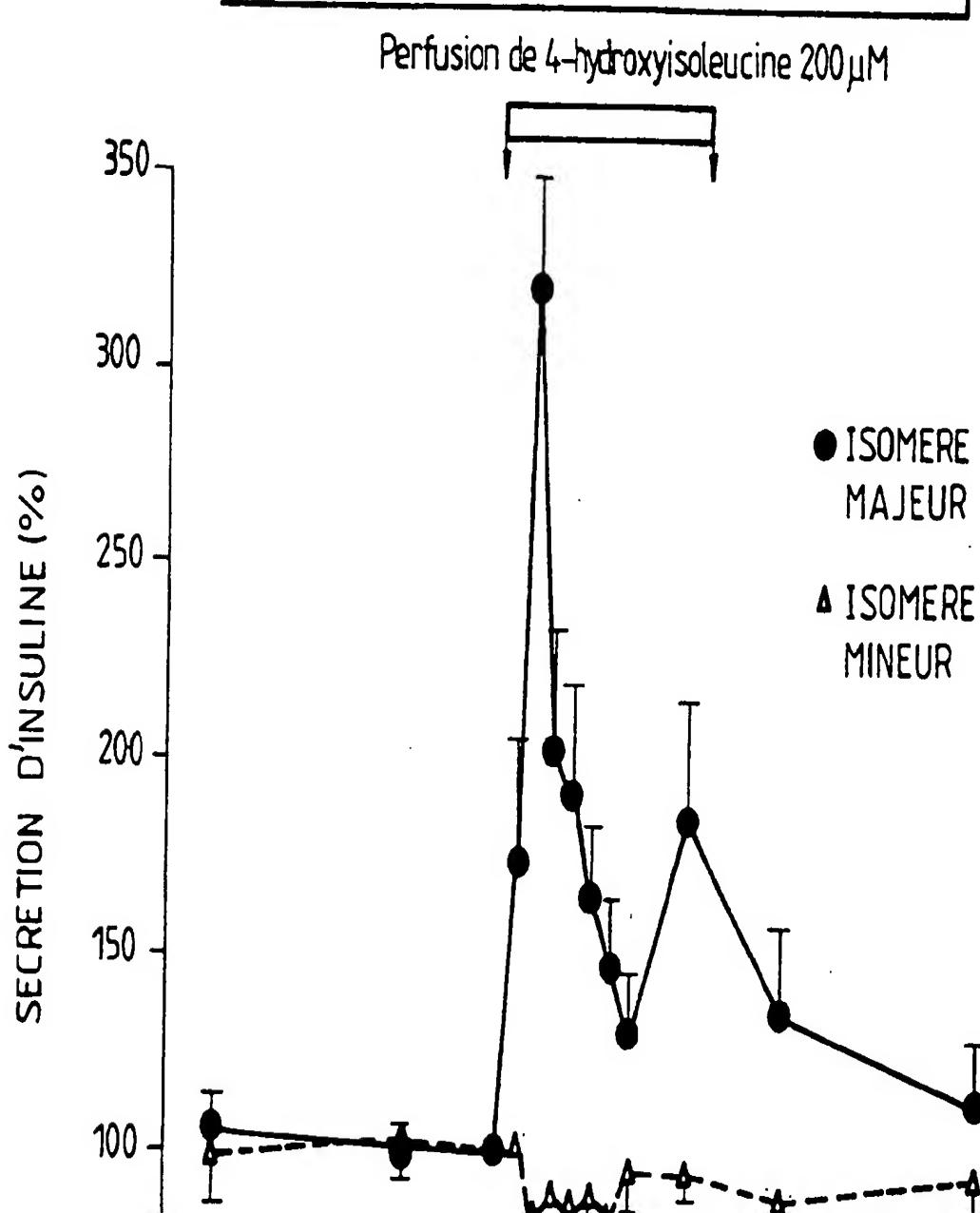
FIG. 2

2745718

8/8

Effet sur la sécrétion d'insuline d'un pancréas isolé de rat
d'une perfusion de 4-hydroxyisoleucine à la concentration de
 $200 \mu\text{M}$ pendant 10 min.

PERFUSION DE GLUCOSE 8.3 NM



RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche2745718
N° d'enregistrement
nationalFA 527020
FR 9602955

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
T	DIABETOLOGIA, vol. 39, 1 Septembre 1996, page A234 XP000610228 * résumés no. 887 et 888 * ---	1-4
X	DIABETOLOGIA, vol. 38, 12 Septembre 1995, page A101 XP002020594 P. PETIT ET AL.: "INSULIN STIMULATING EFFECT OF AN ORIGINAL AMINO ACID, 4-HYDROXYISOLEUCINE, PURIFIED FROM FENUGREEK SEEDS" * résumé no.388 * ---	1-4
D,X	EP 0 587 476 A (LABORATOIRES MONAL) 16 Mars 1994 * le document en entier * ---	1-4
D,A	PHYTOCHEMISTRY, vol. 28, no. 7, 1989, pages 1835-1841, XP000610220 N.W. ALCOCK ET AL.: "STEREOCHEMISTRY OF THE 4-HYDROXYISOLEUCINE FROM TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM" * le document en entier * ---	1-4 DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.)
A	TETRAHEDRON, vol. 47, no. 32, 1991, pages 6469-6482, XP000611434 T. INGHARDT ET AL.: * page 6470, alinéa 5 * * page 6480 * ---	1-4 A61K -/-

1

EPO FORM 1501 03 02 (PMDCL)	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
	9 Décembre 1996	Hoff, P
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général	D : cité dans la demande	
O : divulgation non écrite	L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire	A : membre de la même famille, document correspondant	

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2745718
N° d'enregistrement
national

FA 527020
FR 9602955

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	<p>NEW TRENDS IN NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY, 1986, pages 123-141, XP002020595 M. HASAN: "THE DIASTEREOMERIC Y-HYDROXY-ISOLEUCINES" * abrégé * * page 124 *</p> <p>-----</p>	1-4
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
1	Date d'achèvement de la recherche 9 Décembre 1996	Examinateur Hoff, P
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

